

wenig Radiojod und sind also durch die gewöhnlichen nucleonischen Techniken nicht darstellbar. Bei der hier beschriebenen Methode lassen sie sich chemisch direkt nachweisen. Die Jodthyronine sind dagegen, angeblich wegen ihrer niedrigen Blutkonzentration, chemisch nicht erfassbar, kommen aber durch radioaktive Isotope sehr gut zur Darstellung. Die Anwendung von Radiojod erscheint also unentbehrlich, um eine vollständige Darstellung aller zirkulierenden JPA zu erreichen. Es be-

steht die Möglichkeit, aus der hier beschriebenen kombinierten Extraktion und DC-Trennung, eine klinisch brauchbare Methode zu entwickeln, bei welcher bei niedriger Dosis von Radiojod in Kombination mit einem chemischen Jodnachweis eine vollständige Darstellung der Serum-JPA möglich ist.

Fräulein H. KERLER sind wir für hervorragende technische Hilfe und Fräulein E. KEIPER für die Hilfe am Manuskript zu Dank verpflichtet.

Literatur

1. TAUROG, A., I. L. CHAIKOFF und W. TONG, *J. biol. Chemistry* 184, 99 (1950). — 2. JOHNSON, H. W. und A. ALBERT, *Endocrinology* 48, 669 (1951). — 3. RANDALL, R. V. und A. ALBERT, *Endocrinology* 48, 327 (1951). — 4. BENUA, R. S. und B. M. DOBYNS, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 15, 118 (1955). — 5. WELLBY, M. L., *Austral. J. exp. Biol. med. Sci.* 40, 404 (1962). — 6. GEORGI, M. und K. E. SCHEER, in: *Radio-Isotope in der Endokrinologie*, S. 121. Hrsg. von G. Hoffmann, F. K. Schattauer-Verlag, Stuttgart (1965). — 7. TREVOROW, W., *J. biol. Chemistry* 127, 737 (1936). — 8. TAUROG, A. und I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 176, 639 (1948). — 9. STANBURY, J. B. und M. L. MORRIS, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 17, 1324 (1957). — 10. PITT-RIVERS, R., *N. Y. State J. Med.* 63, 43 (1963). — 11. WERNER, S. C. und I. RADICHEVICH, *Nature* (London) 197, 887 (1963). — 12. DUNN, J. T. und S. C. WERNER, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 24, 460 (1964). — 13. BÉRAUD, T., *Schweiz. med. J* 90, 1340 (1960). — 14. KLEIN, E., *Klin. Wschr.* 40, 3 (1962). — 15. STANBURY, J. B. und A. QUERIDO, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 16, 1522 (1956). — 16. KUSAKABE, T. und T. MIYAKE, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 24, 456 (1964). — 17. WERNER, S. C., V. V. ROW und I. RADICHEVICH, *J. Clin. Endocr.*, Springfield 20, 1373 (1960). — 18. EMRICH, D., *Radio-Isotope in der Endokrinologie*, S. 145. Hrsg. von G. Hoffmann, F. K. Schatt-

aue-Verlag, Stuttgart (1965). — 19. WERNER, S. C. und R. J. BLOCK, *Nature* (London) 183, 406 (1959). — 20. BLOCK, R. J., S. C. WERNER, R. H. MANDL, V. V. ROW und I. RADICHEVICH, *Arch. Biochem. Biophysics* 88, 98 (1960). — 21. HOLLINGSWORTH, D. R., M. DILLARD und P. K. BONDY, *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 62, 346 (1963). — 22. GRIES, G., K. H. PFEFFER und E. ZAPPI, *Klin. Wschr.* 43, 515 (1965). — 23. ZAPPI, E., *J. Chromatography*, z. veröff. — 24. GMELIN, R. und A. I. VIRTANEN, *Acta chem. Scand.* 13, 1469 (1959). — 25. BJÖRKSTEN, F., R. GRÄSBECK und B. A. LAMBERG, *Acta chem. Scand.* 15, 1165 (1961). — 26. WALDI, D., *Dünnschichtchromatographie*, S. 496. Hrsg. von E. Stahl. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962). — 27. ACLAND, D. J., *Nature* (London) 170, 32 (1952). — 28. STANLEY, P. G., *Nature* (London) 171, 933 (1953). — 29. ROCHE, J., R. MICHEL und E. VOLPERT, *C. R. Séances Soc. Biol.* 148, 21 (1954). — 30. OWEN, CH. A., B. F. MC KENZIE und A. L. ORWING, *J. Lab. und Clin. Med.* 47, 145 (1956). — 31. KENNEDY, T. H., *Nature* (London) 179, 50 (1957). — 32. TAUROG, A., G. D. POTTER und I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 213, 119 (1955). — 33. TONG, W. und I. L. CHAIKOFF, *J. biol. Chemistry* 232, 939 (1958). — 34. MAN, E. B., *J. Laborat. Clin. Med.*, S. Louis 59, 528 (1962).

E. Zappi

1 Berlin 41, Rubensstraße 125

Bestimmung von Schilddrüsenhormonen im Serum mittels Gelfiltration und Ionenaustauscher

Von G. GYERTYÁNYFI und J. FÖLDES

Aus der I. Medizinischen Universitätsklinik Budapest (Direktor: Prof. Dr. Imre Magyar)

(Eingegangen am 13. Januar 1967)

Es wird eine zur Trennung des Jodid-, Tyrosin- und Thyroningehaltes im Serum geeignete kombinierte Gelfiltration-Ionenaustauscher-Methode beschrieben. Die Vorteile des Verfahrens, seine Schwierigkeiten und die Ergebnisse der durchgeführten Tierversuche werden eingehend erörtert.

A combined gel filtration — ion exchange method is reported for the separation of the iodide, tyrosine and thyronine of serum. The advantages and difficulties of the method, and the results from an appropriate animal experiment are discussed in detail.

Bei den im Verlauf der Schilddrüsenfunktion in den Kreislauf gelangenden Hormonen handelt es sich um jodierte Aminosäuren. Außer diesen wird noch eine geringe Jodidmenge sezerniert. Im Plasma können diese Komponenten — wegen ihrer geringen Menge — nur mit schwerfälligen und zeitraubenden Methoden nachgewiesen und bestimmt werden. Die Anwendung von radioaktiven Isotopen erleichtert zwar die Isolierung, doch bestehen die Trennungsprobleme auch weiterhin. Zur Trennung dieser jodierten Aminosäuren benutzt man heute vorwiegend die papierchromatographische

Methode. Wird das Wanderungsmedium zweckentsprechend gewählt, so können wir die inaktiven Komponenten ebenso wie die radioaktiven separieren.

Beim Nachweis der Schilddrüsenhormone besteht die eigentliche Schwierigkeit in der Trennung der jodierten Aminosäuren vom Serum. Die hierbei angewendeten Manipulationen, wie Extraktion, Eindampfen, mehrmaliges Zentrifugieren, können zu hochgradiger Dejodierung führen, wodurch mitunter die Ergebnisse verfälscht werden. Viele Literaturangaben und eigene Erfahrungen deuten auf diese Tatsache hin (1—4). Um die

Dejodierung zu vermeiden, muß ein Isolierungsverfahren ausgearbeitet werden, bei dem die erwähnten dejodierungsfördernden Manipulationen wegfallen. Für diesen Zweck scheinen die Gelfiltration und der Ionenaustauscher geeignet. Nach Literaturangaben lassen sich mit der Gelfiltration die Jodide und das eiweißgebundene Jod (im weiteren „PBI“) gut voneinander trennen (5, 6, 7, 10), während der Ionenaustauscher die Trennung und Bestimmung von Tyrosin und Thyronin ermöglicht. Bei unseren Untersuchungen gingen wir von den Arbeiten von PITT-RIVERS sowie MÜLLER und Mitarbeiter aus (8, 9). Durch gleichzeitige Anwendung von Gelfiltration und Ionenaustauscher suchten wir eine Methode auszuarbeiten, die sich zum Nachweis des Jodid-, Tyrosin- und Thyroningehaltes im Plasma eignet. Zunächst klärten wir in Modellversuchen die Zuverlässigkeit der Methode; sodann untersuchten wir tierexperimentell, inwieweit die im Serum enthaltenen Schilddrüsenhormone nach diesem Verfahren bestimmt werden können.

Methodik und Ergebnisse

Reagenzien

^{131}I -Trijodthyronin und Thyroxin (Radiochemical Centre, Amersham);

^{14}C -Dijodtyrosin („Reanal“);

konz. NH_3 ; 10-proz. Essigsäure; 50-proz. Essigsäure;

Dextrangel Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Uppsala);

Ionenaustauscher Dowex 1 x 2, 50–110 mesh (Fa. Dow Chemical Corp.);

0,066M Na_2HPO_4 -Lösung.

Gelfiltration

Wir benutzten eine 16 cm hohe Säule mit 1 cm Durchmesser. Im Verlauf der Modellversuche wurde dem Serum soviel Na^{131}J oder markiertes Hormon zugesetzt, daß seine spezifische Aktivität 0,04–0,05 $\mu\text{C}/\text{ml}$ betrug. Dieses Substrat wurde 60 Min. bei 37° inkubiert. 1 ml des inkubierten Serums übertrugen wir auf die Sephadex-Säule, wonach mit 0,066M Na_2HPO_4 -Lösung eluiert und 15 Fraktionen à 1 ml gesammelt wurden. Die Radioaktivität der Fraktionen bestimmten wir im Bohrlochkristall.

Tab. 1
Rückgewinnung mittels Gelfiltration. Werte in %;
Durchschnittsergebnis von 5 Versuchen

	Rückgewinnung	Bereich
Na^{131}J	94,95	94,56–96,23
Trijodthyronin- ^{131}J	94,92	94,29–95,15
Thyroxin- ^{131}J	96,13	96,02–96,60

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, können mittels Gelfiltration sowohl Na^{131}J als auch ^{131}J -Trijodthyronin und Thyroxin gut eluiert werden. Die Rückgewinnung betrug in allen Fällen durchschnittlich 95%. Abbildung 1 zeigt, daß das markierte Trijodthyronin und Thyroxin in den Fraktionen 2–5 scharf zutage tritt. Abbildung 2 hingegen demonstriert, daß wir Na^{131}J überwiegend in den Fraktionen 5–15 zurückgewinnen, obschon etwa 5% auch in den Fraktionen 2–5 erscheinen.

Ionenaustauscher

Vorbereitung bzw. Regeneration des Ionenaustauschers

Das Harz wird mit einem Gemisch 2:1 von konz. Ameisensäure und konz. Essigsäure 6 Stdn. im Wasserbad gekocht, dann filtriert,

mit Wasser neutral gewaschen, mit wenig Alkohol gespült und getrocknet. Das Verfahren wiederholen wir mit 6N Salzsäure, wonach das Substrat mit 3N Salzsäure drei Stdn. im Wasserbad gekocht wird. Hiernach filtrieren wir, waschen mit Wasser neutral und bewahren es gut abgesaugt im Kühlschrank auf.

Bindung von Tyrosinen und Thyroninen

Wir untersuchten, wie die markierten Hormone vom Harz Dowex 1 x 2 — teils in dest. Wasser, teils in Serum als Medium — gebunden werden. Die spezifische Aktivität der Lösung stimmte mit der vorher beschriebenen überein. Zu 5 ml der zu untersuchenden Lösung wurden 2,5–3,0 ml Ionenaustauscher gegeben. Die Versuche nahmen wir einerseits im neutralen, andererseits in dem mit 1 ml konz. NH_3 alkalisierten Medium vor. Es wurde zwei Stunden mit der Schüttelmaschine geschüttelt, das Harz sodann durch einen Glasfilter filtriert und die

Tab. 2
Bindung am Ionenaustauscher. Werte in %;
Durchschnittsergebnis von 4 Versuchen

Verbindung	Medium	Reaktion	Bindung	Bereich
Trijodthyronin- ^{131}J	Dest. Wasser	neutral	99,70	99,20–99,90
		alkalisch	99,43	99,10–99,80
	Serum	neutral	84,18	83,80–84,50
		alkalisch	98,18	98,00–99,00
Thyroxin- ^{131}J	Dest. Wasser	neutral	99,37	98,90–99,60
		alkalisch	99,60	99,10–100,1
	Serum	neutral	84,31	84,02–84,71
		alkalisch	99,66	99,32–99,87
Dijodtyrosin- ^{14}C	Dest. Wasser	neutral	99,59	99,31–99,75
		alkalisch	99,72	99,41–99,91
	Serum	neutral	83,90	82,97–84,30
		alkalisch	98,69	98,02–98,87

Radioaktivität des Filtrates im Bohrlochkristall bestimmt. Das filtrierte Harz durchspülen wir mit wenig Alkohol und ließen es bei Zimmertemperatur oder bei 37° trocknen. Die Resultate veranschaulicht Tabelle 2. Nach unseren Daten wird das der Lösung zugegebene Trijodthyronin, Thyroxin und Dijodtyrosin vom Ionenaustauscher fast vollständig gebunden. In destilliertem Wasser als Medium spielte die Reaktion keine Rolle; in Serum als Medium trat eine vollständige Bindung jedoch nur im Falle alkalischer Reaktion ein.

Untersuchung der Elution

Der Versuch wurde mit markiertem Trijodthyronin ausgeführt, dann gingen wir dem vorangegangenen Abschnitt entsprechend vor. Hiernach setzten wir dem Harz 5 ml Lösungsmittel zu. Die Elution erfolgte mittels 10-proz. und 50-proz. Essigsäure und einem Gemisch 2:1 von konz. Ameisensäure und konz. Essigsäure. Nach Zugabe des Lösungsmittels wurde der Ionenaustauscher in der Schüttelmaschine zwei Stdn. geschüttelt, dann durch einen Glasfilter filtriert und die Radioaktivität des Filtrates im Bohrlochkristall gemessen. Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, hat die 10-proz. Essigsäure das am Austauscher gebundene Trijodthyronin kaum eluiert, während das Gemisch 2:1 von konz. Ameisensäure und konz. Essigsäure bereits bei der ersten Gelegenheit 77,22% markiertes Hormon eluierte.

Im weiteren untersuchten wir die Ablösbarkeit von Dijodtyrosin und Trijodthyronin, die wir als Funktion der

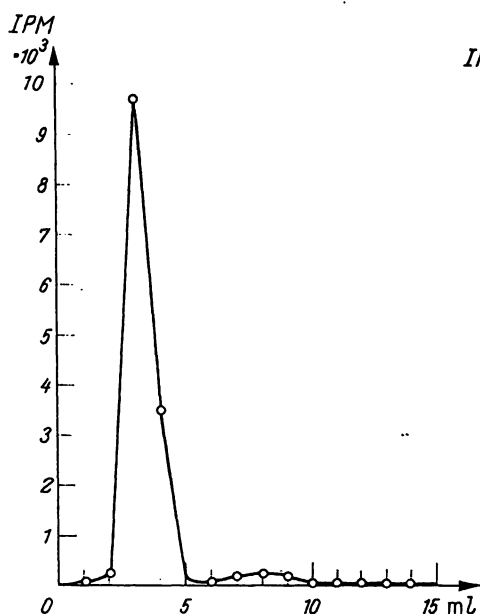


Abb. 1

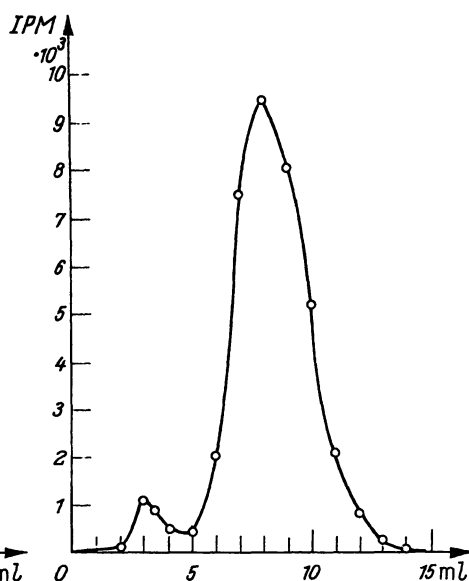
Gelfiltration von $T^{131}IT$ und $T_3(^{131}I)$ 

Abb. 2

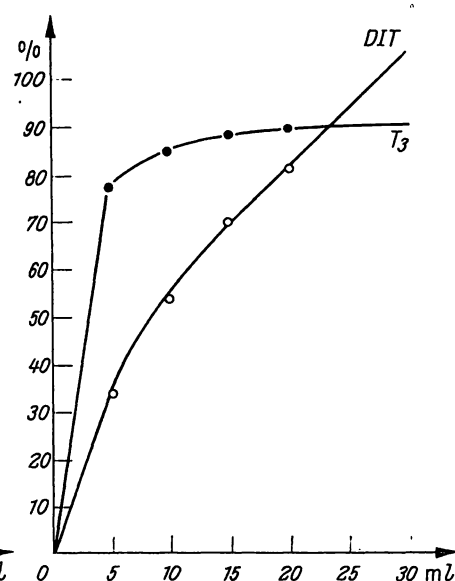
Gelfiltration von $Na^{131}J$ 

Abb. 3

Ablösbarkeit von DIT und T_3 vom Ionenaustauscher als Funktion der Lösungsmittelmenge

Tab. 3

Ablösbarkeit der Thyronine vom Ionenaustauscher mit verschiedenen Lösungsmitteln; Durchschnittsergebnis von 4 Versuchen

Lösungsmittel	Abgelöste Menge %	Bereich %
10-proz. Essigsäure	2,24 ¹⁾	1,63—3,49
50-proz. Essigsäure	34,16	33,70—35,14
Gemisch 2:1 von konz. Ameisensäure und konz. Essigsäure	77,22	74,98—78,50

¹⁾ Durchschnittsergebnis von 10 Versuchen.

Tab. 4

Ablösbarkeit von Dijodtyrosin- ^{14}C und Trijodthyronin- ^{131}J vom Ionenaustauscher als Funktion der Lösungsmittelmenge. Durchschnittsergebnis von 4 Versuchen

Verbindung und Lösungsmittel	Zahl der Fraktionen	ml	Abgelöste Menge %
Dijodtyrosin- ^{14}C	1 ¹⁾	5	33,58
10-proz. Essigsäure	2	10	54,00
	3	15	69,61
	4	20	80,99
Trijodthyronin- ^{131}J	1	5	77,22
Gemisch 2:1 von konz. Ameisensäure und konz. Essigsäure	2	10	85,11
	3	15	88,29
	4	20	89,62

¹⁾ Durchschnittsergebnis von 12 Versuchen

Lösungsmittelmenge demonstrieren (Tab. 4 und Abb. 3). Wird die Lösungsmittelmenge entsprechend erhöht, so kann Dijodtyrosin vollständig vom Austauscher eluiert werden. Zugleich läßt sich Trijodthyronin — obschon bereits beim einmaligen Durchlaufen eine erheblich größere Menge eluiert wird als von Dijodtyrosin — auch dann nicht vollkommen ablösen, wenn die Lösungsmittelmenge vermehrt wird. Im Falle von Dijodtyrosin kommt es indessen infolge der verhältnismäßig großen Lösungsmittelmenge zu einer starken Verdünnung des markierten Hormons, die meßtechnische Schwierigkeiten verursachen kann. Um diese Schwierigkeit zu vermeiden, gehen wir am besten so vor, daß wir eine einmalige Eluierung anwenden; in diesem Fall läßt sich die Aktivität noch verhältnismäßig gut bestimmen. Wir berechnen nach folgender Formel die % Tyrosin im Serum:

$$D \% = \frac{N - 0,02 N_0}{0,31} \cdot \frac{100}{N_0}$$

D% = % Tyrosin im Serum

N = Aktivität in JPM der mit Essigsäure eluierten Fraktion

 N_0 = Gesamtaktivität des Serums.

Diese Formel ergibt sich aus folgender Überlegung:

Nehmen wir die Gesamtaktivität des Serums als N_0 , wobei diese die gesamte Menge der Tyrosine (D) und Thyronine (T) beinhaltet:

$$D + T = N_0$$

Die Aktivität der mit Essigsäure eluierten Fraktion ist gleich N; diese enthält zu 33% die Tyrosine und zu 2% die Thyronine, d. h.

$$D + T = N_0$$

$$0,33 D + 0,02 T = N,$$

daraus ist

$$D = \frac{N - 0,02 N_0}{0,31}$$

und

$$D \% = \frac{N - 0,02 N_0}{0,31} \cdot \frac{100}{N_0}.$$

Wir werden die ausführliche mathematische Analyse der mit den Berechnungen verbundenen Fragen in einer späteren Arbeit besprechen.

Untersuchung an Rattenserum

Ratten dosierten wir intraperitoneal $50 \mu C Na^{131}J$ und untersuchten 2, 6, 24 und 72 Std. nach Zufuhr des Isotops den Jodid-, Tyrosin- und Thyroningehalt im Serum.1 ml Rattenserum wurde auf die Sephadexsäule übertragen; im übrigen gingen wir wie in Abschnitt „Gelfiltration“ beschrieben vor. Nach Vereinigung der PBI-Fractionen alkalisierten wir diese mit 1 ml konz. NH_3 , setzten 2,5—3,0 ml Ionenaustauscher zu und ließen das Substrat zwei Stunden in der Schüttelmaschine schütteln. Nach Filtration wurde der Austauscher mit wenig Al-

kohol durchgespült und getrocknet. Zwecks Ablösung der Tyrosine wurden dem trockenen Austauscher 5 ml/10-proz. Essigsäure zugesetzt, das Substrat zwei Std. in der Schüttelmaschine geschüttelt, dann filtriert und die Radioaktivität des Filtrates bestimmt. Nunmehr gingen wir im Sinne des Abschnittes „Eluierung“ vor. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt, die Werte in Prozent der Serum-Gesamtaktivität angegeben.

Tab. 5
Ergebnisse der Untersuchung des Rattenserums.
Durchschnittsergebnis von 4 Versuchen; Werte in %

Zeit (Stunden)	CR	Anorganisches Jod (J ⁻)	Monojod + Dijod Tyrosin (¹³¹ J)	Trijodthyronin + Thyroxin (¹³¹ J)
2	4,13	95,85	0,44	3,71
6	34,03	65,97	2,90	31,13
24	82,95	17,05	4,79	78,16
48	95,25	4,75	2,15	93,10
72	96,40	3,60	5,04	91,34

Diskussion

Nach unseren Befunden kann PBI mittels Gelfiltration leicht von den anorganischen Jodiden getrennt werden. Bemerkenswert sei, daß bei der Gelfiltration von Na¹³¹I eine Menge von etwa 5% an der Stelle von PBI eluiert wird. Gegenwärtig suchen wir nach der Ursache dieser Erscheinung. Vermutlich wird ein kleiner Teil des Jodids nur locker an die Serumproteine adsorbiert. Die Schilddrüsenhormone werden in ammoniakhaltigem Medium vom Ionenaustauscher praktisch gebunden bzw. vom Serum getrennt. In neutralem Medium bleiben etwa 15–16% der Aktivität im Serum zurück. Diese unsere Beobachtung erhärtet die frühere Feststellung von PITT-RIVERS und Mitarbeitern (8). Es ergibt sich die Frage, worauf diese Erscheinung beruht. Wahrscheinlich sind die Serumeiweißstoffe in neutralem Medium imstande einen Teil des zugegebenen markierten Hormons stärker als der Ionenaustauscher zu binden. Nach Zusatz von Ammoniak dagegen kommt es zur partiellen oder vollständigen Denaturierung der Serumproteine, so daß sie die Hormone nicht mehr zu binden vermögen. Infolgedessen wird die gesamte markierte Hormonmenge vom Austauscher gebunden.

In der Literatur wird zur Elution der Tyrosine 10-proz. Essigsäure, zur Ablösung der Thyronine 50-proz. Essig-

säure (8) oder eine Säuregemisch (9) empfohlen. Nach unseren in Tabelle 3 angegebenen Daten werden die Thyronine von 10-proz. Essigsäure kaum eluiert. Das bei der Ablösung der Tyrosine gewonnene Resultat wird also von dem am Austauscher gebundenen Thyronin nicht beeinträchtigt. Aus unseren Versuchen darf ebenfalls geschlossen werden, daß sich die 10-proz. Essigsäure zur Ablösung der Tyrosine eignet. Zugleich bedarf es zur Ablösung der Thyronine des Gemisches 2 : 1 von konz. Ameisensäure und konz. Essigsäure.

Das beschriebene Verfahren dürfte sich demnach zur Trennung des Jodid-, Tyrosin- und Thyroningehaltes im Serum eignen. Es hat den Vorteil der leichten und raschen Durchführbarkeit; überdies vermeiden wir Manipulationen, welche die Dejodierung begünstigen. Dennoch ergeben sich bei der Anwendung zahlreiche Probleme, die wir gegenwärtig untersuchen. So bedarf es zur vollständigen Ablösung der Tyrosine mehrmaliger Elution, was zu beträchtlicher Verdünnung des eluierten, markierten Tyrosins führt. Diese kann ein derartiges Ausmaß annehmen, daß meßtechnische Schwierigkeiten entstehen. Nach Dosierung einer hohen (therapeutischen) Na¹³¹J-Dosis bedeutet die Verdünnung kein Problem; wollen wir aber die Untersuchung nach Dosierung von 400–500 µC Na¹³¹J vornehmen, so kann sich bereits ein wesentliches Problem ergeben. In derartigen Fällen führten wir die einmalige Ablösung durch und die im Teil „Methodik“ bekanntgegebene Formel dient als Grundlage zur Berechnung der Tyrosine in %.

Eine andere Schwierigkeit der beschriebenen Methode liegt darin, daß wir Thyroxin und Trijodthyronin einstweilen nicht voneinander trennen können. Unsere diesbezüglichen Untersuchungen sind gleichfalls zur Zeit im Gange.

Das im Modellversuch erfolgreich ausgearbeitete Verfahren suchten wir in die Praxis zu übertragen, indem wir den Jodid-, Tyrosin- und Thyroningehalt im Rattenserum zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Radiojodzufuhr bestimmten. Einigen Autoren gelang es, Jodotyrosine im Rattenserum nachzuweisen (11–17), anderen dagegen nicht (18–26). Unsere Befunde bestätigen die Ergebnisse der ersteren.

Literatur

1. TAUROG, A., *Endocrinology*, 73, 1, 57–62 (1963).
2. TAUROG, A., *Endocrinology*, 73, 1, 45–46 (1963).
3. KNOPP, J. und V. STOLC, *Physiologia Bohemoslovenica*, 14, 186 (1965).
4. ROSENBERG, L. I. und G. LA ROCHE, *Endocrinology*, 75, 5, 776–786 (1964).
5. RABINOWITZ, J. L. und B. SHAPIRO, *Nucl. Med.*, 3, 417 (1962).
6. RABINOWITZ, J. L., B. SHAPIRO und P. JOHNSON, *Nucl. Med.*, 4, 139 (1963).
7. STUMPF, W. und E. H. GRAUL, *Med. Klinik*, 58, 5, 192–196 (1963).
8. GALTON, V. A. und R. PITT-RIVERS, *Biochem. J.*, 72, 310 (1959).
9. MÜLLER, K., H. SKRUBE und H. SPITZKY, *Mikrochim. Acta*, 2, 1144–1151 (1962).
10. SPITZKY, H., H. SKRUBE und K. MÜLLER, *Microchim. Acta*, 296 (1961).
11. TREVORROE, V., *J. Biol. Chem.*, 127, 237 (1939).
12. WILMAN, H., *Z. ges. exp. Med.*, 11, 21 (1943).
13. MANL, R. H. und R. J. BLOCK, *Arch. Biochem. Biophys.*, 81, 25 (1959).
14. WERNER, S. C. und R. J. BLOCK, *Nature*, 183, 405 (1959).
15. BLOCK, R. J., R. H. MANL und H. W. HOWARD, *Arch. Biochem. Biophys.*, 93, 15 (1961).
16. DEALE, D. und J. K. WHITEHEAD, *Clin. Chim. Acta*, 5, 195 (1960).
17. BALOGH, I. und P. KERTAI, *Orv. Hetil.*, 104, 4, 154–156 (1963).
18. MACLAGAN, N. F., C. H. BOWDEN und J. H. WILKINSON, *Biochem. J.*, 67, 5 (1957).
19. PIND, K., *Acta Endocr.*, 6, 263 (1957).
20. WYNN, J., *Arch. Biochem. Biophys.*, 87, 120 (1960).
21. BARNA, S., G. SZABO, GY. FEUER und R. BALOGH, I., *Acta Med. Hung.*, 10, 339 (1967).
22. TAUROG, A., I. L. CHAIKOFF und W. TONG, *Biol. Chem.*, 184, 99 (1950).
23. LAIDLAW, J. C., *Nature*, 164, 927 (1949).
24. ROCHE, J. und R. MICHEL, *Physiol. Rev.*, 35, 583 (1955).
25. LYBECK, H., *Acta Med. Scand.*, 158, Suppl. 327, 6 (1957).
26. RUEGAMER, W. R. und R. B. CHODOS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 81, 25 (1959).

Dr. G. Gyertyányi, Budapest VIII/Ungarn, Korányi S. W. 2/9